

Difetur-ul atenuază leziunile hepatice induse de șocul hemoragic

A. Vișnevschi

Catedra Fiziopatologie și Fiziopatologie clinică, USMF „Nicolae Testemițanu”

Difetur Attenuates Liver Injury Induced by Hemorrhagic Shock

Hemorrhagic shock (HS) results in pronounced increases in circulating concentrations of aspartate (AST), alanine (ALT) aminotransferase, glutamate dehydrogenase (GLDH), IL-1 α , IL-6 and TNF- α concentrations associated with histologic alterations of the liver, including midzonal necrosis, hydropic changes, polymorpholeukocyte infiltration. These changes in histologic and clinical chemistry are secondary to tissue hypoxia associated with hypovolemic shock. Administration of Difetur (iNOS inhibitor) after the induction of severe HS significantly attenuated the proinflammatory response both systemically and locally in the liver. Treatment with Difetur prevented neutrophil infiltration into the liver and subsequent liver damage.

Key words: hemorrhagic shock; resuscitation; Difetur; morphology; liver, AST, ALT.

Дифетур уменьшает повреждения печени при геморрагическом шоке

Геморрагический шок сопровождается повышением в крови уровня аспарат – (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), глутаматдегидрогеназы, ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ФНО- α , что ассоциируется с гистологическими изменениями в печени, которые проявляются некрозом, отеком и лейкоцитарной инфильтрацией. Дифетур (iNOS-ингибитор) значительно снижает уровень провоспалительных медиаторов в крови, а также уменьшает лейкоцитарную инфильтрацию в печени, вызванные геморрагическим шоком.

Ключевые слова: геморрагический шок, дифетур, морфология печени, АЛТ, АСТ.

Introducere

Pacienții care supraviețuiesc în fazele inițiale ale șocului hemoragic (ȘH) pot dezvolta sindromul inflamator sistemic, care induce leziuni celulare în organele de importanță vitală [1]. Actualmente, mecanismele implicate în patogenia șocului hemoragic sunt definite incomplet. Șocul hemoragic induce stresul oxidativ și răspunsul inflamator, cu creșterea expresiei mediatorilor proinflamatori și a citochinelor. Acești factori pot favoriza dezvoltarea leziunilor celulare ireversibile, cu tulburarea funcțiilor organelor și ale sistemelor de organe [2].

Un rol decisiv în menținerea homeostaziei organismului uman este atribuit ficatului, organ care frecvent este afectat în cadrul stărilor extreme, inclusiv în șocul hemoragic. Hipotensiunea arterială sistemică favorizează dereglarea circulației sangvine regionale, cu dezvoltarea ischemiei, a hipoxiei și a hiponutriției hepatice. În consecință, tulburările metabolice induse de hipoxie, generează specii reactive de oxigen care amplifică procesul de peroxidare a lipidelor, cu lezarea membranelor celulare [3]. O importanță majoră în dezvoltarea sindromului inflamator sistemic este atribuită excesului de monoxid de azot (NO) care, în combinație cu superoxidul, formează radical peroxinitrit (ONOO), cu toxicitate foarte înaltă provocând leziuni celulare.

NO se formează la transformarea L-argininei în L-citrulină, pe calea șuntată a ciclului ornitinic, sub acțiunea unor enzime specifice denumite nitricoxidsintaze (NOS). Ultimele, în funcție de caracterul biochimic, localizare cuprind 3 izoforme: NOS1, NOS2 și NOS3. NOS1 (nNOS) a fost identificată în creier; NOS2 (iNOS), depistată inițial în macrofage, se caracterizează printr-un nivel funcțional activ în cadrul proceselor inflamatorii. NOS3 (eNOS), identificată inițial în endoteliu, are masa moleculară egală cu 133 kDa, este insolubilă, fiind dispusă numai la nivel membranal [4].

Șocul hemoragic scade activitatea nitricoxidsintazei endoteliale (eNOS), dar crește expresia și activitatea iNOS [5]. Unii autori [5, 6] au demonstrat că inhibiția NOS este urmată de reducerea leziunilor celulare în organe și de creșterea viabilității. Aceste fenomene demonstrează rolul NO în dezvoltarea leziunilor celulare din șocul hemoragic.

Scopul prezentului studiu constă în aprecierea efectului Difetur-ului asupra leziunilor hepatice induse de șocul hemoragic.

Material și metode

Pentru realizarea experimentelor au fost utilizați 30 de șobolani albi. Animalele au fost întreținute în condiții standarde: temperatura mediului constantă (21-22°C), umiditatea aerului stabilă, regimul întuneric-lumină (12:12 ore), plasate solitar în cușcă. Pentru obținerea aclimatizării, cu șapte zile înainte de efectuarea experimentului, animalele au fost plasate în camera de carantină. Șobolani au fost anesteziați (administrare i/p) cu soluție de cloral hidrat 4% (350 mg/kg masă corporală). Prin abord inghinal pe dreapta a fost detectată vena femurală, care a fost separată și ligaturată distal. Cateterul folosit pentru canulare a fost confecționat din tub de polietilenă PE 20, inserat în PE 50 (Sigma) și heparinizat (10 IU/mL). După ce a fost introdus în venă, capătul distal al cateterului, prin tunel subcutanat a fost exteriorizat în aria interscapulară.

Toate experimentele au fost efectuate strict între orele 09 și 15, pentru a evita diferențele indicilor studiați, dictate de modificările ciclurilor circadiene.

Șocul hemoragic (pe durata de 120 de minute) a fost reprodus prin efuzia a 30% din volumul total de sânge din vena femurală. Difetur-ul a fost administrat intravenos în doză de 20 mg/kg masă corporală, după 120 de minute de la inducerea șocului.

Nivelul IL-1 α , IL-6, IL-10 și TNF- α în serul sangvin a fost determinat prin metoda imunoenzimatică (conform instrucțiunii), cu utilizarea chitului de reactive (ELISA; R&D Systems). Alaninaminotransferaza (ALT), aspartataminotransferaza (AST) și glutamat dehidrogenaza (GLDH) au fost apreciate utilizând chitul de reactive (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Probele de țesut din ficat, pentru investigația morfologică, au fost prelevate de la animale inițial (până la hemoragie), după 120 de min șoc hemoragic și de la animalele cu șoc hemoragic resuscitate cu Difetur, după 90 de min. Fragmentele tisulare au fost fixate în soluție 8% de formol și incluse în parafină, iar secțiunile histologice – colorate cu hematoxilină-eozină și cu picrofucsină, metoda van Gieson, și studiate la microscopul optic.

În funcție de sarcinile abordate au fost delimitate 3 loturi:

- Lotul I (n=10) – martor.
- Lotul II (n=10) – șoc hemoragic pentru perioada de 120 de min.
- Lotul III (n=10) – șoc hemoragic pentru perioada de 120 de min, resuscitat cu Difetur.

Datele obținute au fost prelucrate computerizat, cu aplicarea setului de programe statistice *Microsoft Excel*. Probabilitatea mai mare de 95%, când $p < 0,05$, s-a considerat drept discrepanță statistică.

Rezultate

Rezultatele obținute în cadrul experimentelor indică că, în cadrul șocului hemoragic (figura 1), a crescut nivelul seric al tuturor enzimelor studiate: ALT – cu 22% ($p < 0,01$); AST – cu 33% ($p < 0,05$); și nivelul GLDH – cu 74% ($p < 0,001$), comparativ cu nivelul acestora la animalele din lotul martor. Administrarea inhibitorului iNOS Difetur la animalele cu șoc a redus nivelul ALT cu 16% și nivelul GLDH – cu 13%. În lotul animalelor cu ȘH, nivelul citokinelor proinflamatoare (figura 2) a crescut comparativ cu nivelul acestora în lotul martor: IL-1 α – cu 153% ($p < 0,001$); TNF α – cu 38% ($p < 0,01$), și nivelul IL-6 – cu 64% ($p < 0,01$); nivelul proteinei C-reactive – cu 104% ($p < 0,001$), iar nivelul IL-10 s-a micșorat cu 51%.

La resuscitarea prin inhibitorul NO-sintazei Difetur, nivelul de citochine proinflamatoare și al proteinei C-reactive a descrescut comparativ cu nivelurile acestora în cadrul

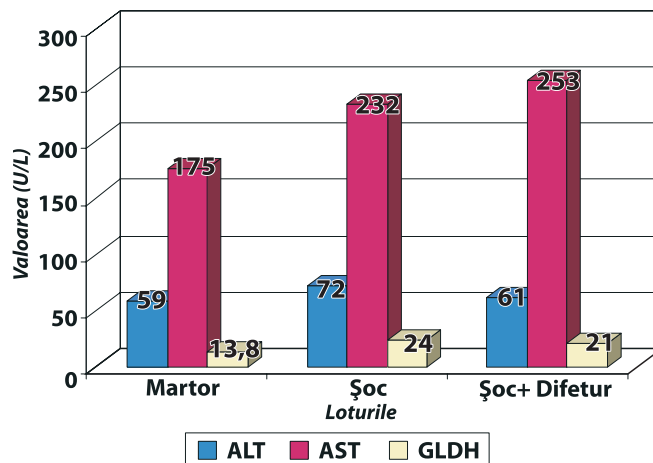


Fig. 1. Nivelul enzimemiei în șocul hemoragic până și după resuscitare cu Difetur.

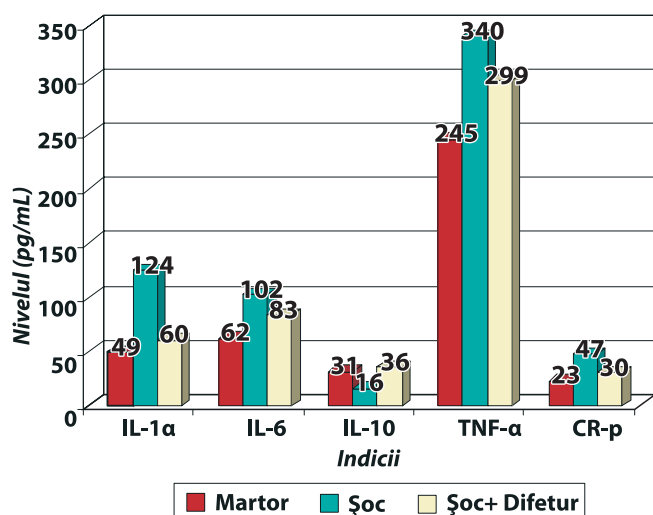


Fig. 2. Modificarea nivelului de citochine și a proteinei C-reactive în serul sangvin în ȘH și după resuscitarea prin inhibitorul iNOS-Difetur.

ȘH: valoarea IL-1 α – cu 52% ($p < 0,01$), a TNF α – cu 13% ($p < 0,05$), a proteinei C-reactive – cu 37% ($p < 0,01$). Valoarea interleukinei-10 a crescut cu 125% ($p < 0,001$).

Examenul histologic al ficatului, efectuat după 120 de min șoc hemoragic (figura 3B), evidențiază focare de necrobioză a hepatocitelor, cu reacție leucolimfocitară, și distrofie granulară

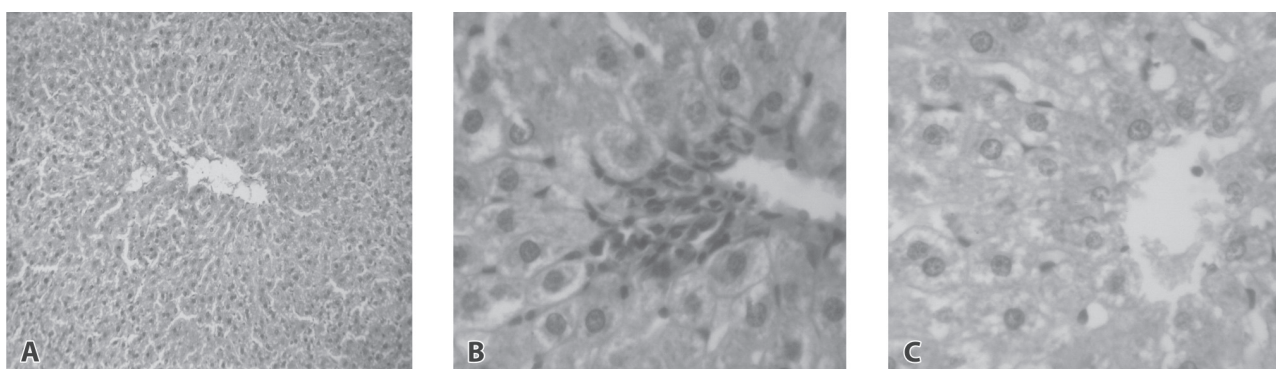


Fig. 3. Modificările histologice în ficat: A – structură normală; B – șoc hemoragic 120 de minute; C – șoc hemoragic, 120 de minute, resuscitat cu Difetur.

și vacuolară a hepatocitelor. După administrarea Difetur-ului (figura 3C), modificările morfologice ale ficatului se manifestă prin distrofie granulară/vacuolară microveziculară a hepatocitelor, infiltrația leucolimfocitară fiind mai slab pronunțată, comparativ cu modificările histologice din ficat la animalele cu șoc hemoragic fără resuscitare.

Discuții

În acest studiu a fost utilizat un model al șocului hemoragic pe șobolani, pentru a testa capacitatea efectului antiinflamator al inhibitorului iNOS Difetur. S-a demonstrat că administrarea Difetur-ului după 120 de minute de șoc hemoragic reduce semnificativ nivelul IL-1 α ($p < 0,01$), al TNF α ($< 0,05$) și al proteinei C-reactive ($p < 0,01$) în serul sangvin. În plus, administrarea Difetur-ului reduce numărul de leucocite acumulate în parenchimul hepatic, fenomen ce coincide cu reducerea în serul sangvin a nivelului ALT și GLDH.

Resuscitarea în șocul hemoragic este urmată de o creștere masivă a producerii de citochine proinflamatoare, așa ca IL-1 α , TNF α , IL-6 de către celulele sistemului imun [7]. Cu toate că strategiile de tratament în ȘH sunt îmbunătățite, în perioada de postresuscitare, pacienții pot dezvolta o reacție inflamatorie sistemică care poate conduce la disfuncție poliorganică și, în final, la deces. În experimentele noastre s-a observat că șocul hemoragic este însoțit de răspuns inflamator sistemic reflectat prin creșterea semnificativă în serul sangvin a nivelului de IL-1 α , TNF α și de IL-6. TNF α în condiții fiziologice este un mediator-cheie în formarea răspunsului imun local împotriva agenților infecțioși și neinfecțioși. Cu toate acestea, producerea necontrolată, exagerată de TNF α poate provoca leziuni celulare și promovează formarea și eliberarea mediatorilor proinflamatori secundari, cum ar fi IL-6. IL-6 este o citochină pluripotentă, care facilitează infiltrarea neutrofilelor în organe, favorizând astfel lezarea acestora. Reducerea nivelului de citochine proinflamatoare din plasmă în șocul hemoragic prezintă o importanță clinică majoră, deoarece nivelurile crescute ale acestora corelează cu micșorarea gradului de supraviețuire a pacienților. Interleuchina 10 a fost identificată ca fiind „factor inhibitor al secreției de citochine”. Efectele biologice ale IL-10 pot fi sistematizate în efecte imunopresoare, antiinflamatoare și imunostimulatoare. Efectele antiinflamatoare ale IL-10 se datorează inhibiției altor funcții ale macrofagului, cum este cea a sintezei de citochine proinflamatoare de tipul IL-1, 6, 8, TNF-alfa, precum și de radicalii liberi ai oxigenului și de derivați nitrici, indusă de activarea antigenică în cadrul răspunsului inflamator. Experimentele noastre au demonstrat o micșorare a nivelului IL-10 în șocul hemoragic și o creștere a nivelului la resuscitarea cu Difetur.

Leziunile hepatice din șocul hemoragic sunt mediate de interleuchine, radicali liberi, leucocitele activate și exacerbarea procesului de apoptoză. Resuscitarea în ȘH poate exacerba leziunile hepatice prin generarea speciilor reactive de oxigen și

prin creșterea producerii de NO pe cale iNOS [8]. În perioada precoce a ȘH, de asemenea, are loc și activarea neutrofilelor, leziunile hepatice fiind amplificate de acumularea acestora în organ. Neutrofilele activate prezintă o sursă potențială de radicali liberi și de monoxid de azot. Excesul de monoxid de azot (NO), în combinație cu superoxidul, formează radicalul peroxinitrit (ONOO), cu o toxicitate înaltă, care poate favoriza amplificarea leziunilor hepatice. Prin urmare, rezultatele studiilor noastre demonstrează că Difetur-ul (inhibitor selectiv al iNOS) reduce leziunile hepatice induse de șocul hemoragic experimental la șobolani [9].

Concluzii

1. Șocul hemoragic induce atât leziunile hepatice locale, cât și modificările biochimice în serul sangvin manifestate prin creșterea nivelului de transaminaze și de citochine proinflamatoare.

2. Difetur-ul a demonstrat un efect hepatoprotector manifestat prin reducerea nivelului seric de ALT, GLDH, IL-1 α , TNF α și de proteina C-reactivă, cu diminuarea infiltrației leucolimfocitare în ficat.

Bibliografie

- Baue A. E., Durham R., Faist E: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock*, 1998; 10: 79-89.
- Keel M., Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*, 2005; 36: 691-709.
- Lehnert M., Uehara T., Bradford B. U., Lind H., Zhong Z., Brenner D. A., Marzi I., Lemasters J. J. Lipopolysaccharide-binding protein modulates hepatic damage and the inflammatory response after hemorrhagic shock and resuscitation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2006; 291: G456-G463.
- Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 1991; 43: 109-142.
- Szabo C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horizons*, 1995; 3 (1): 2-23.
- Collins J. L., Vodovotz Y., Hierholzer C., Villavicencio R. T., Liu S., Alver S., Gallo D., Stolz D. B. et al. Characterization of the expression of inducible nitric oxide synthase in rat and human liver during hemorrhagic shock. *Shock*, 2003; 19: 117-122.
- Lee C. C., Chang I. J., Yen Z. S. et al. Effect of different resuscitation fluids on cytokine response in a rat model of hemorrhagic shock. *Shock*, 2005; 24: 177Y181.
- Uehara T., Bennett B., Sakata S. T., Satoh Y., Bilter G. K., Westwick J. K., Brenner D. A. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J. Hepatol.*, 2005; 42: 850-859.
- Kan W. H., Hsu J. T., Schwacha M. G. et al. Selective inhibition of iNOS attenuates trauma-hemorrhage/resuscitation-induced hepatic injury. *J. Appl. Physiol.*, 2008; Oct; 105(4): 1076-82.

Anatolie Vișnevschi, dr., conferențiar

Catedra Fiziopatologie și Fiziopatologie clinică

USMF „Nicolae Testemițanu”

Chișinău, str. N. Testemițanu, 27

Tel.: 205421, 205423

Recepționat 1.09.2009